

УДК 581.1.

А. А. Ермошин, И. С. Киселева

Уральский федеральный университет
им. Первого Президента России Б. Н. Ельцина,
620000 г. Екатеринбург, пр. Ленина, 51,
Alexander.Ermoshin@urfu.ru

АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫЙ ГЕН СИНТЕЗА ЦИТОКИНИНОВ ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К ВЫСОКИМ ДОЗАМ ИОНОВ МЕДИ

Ключевые слова: трансгенный табак, цитокинины, ионы меди, абиотический стресс, устойчивость.

Растения в течение жизни подвергаются воздействию множества стрессовых факторов. В результате антропогенной деятельности человека происходит загрязнение среды тяжелыми металлами, например ионами меди, особенно это актуально для Уральского региона.

Одним из современных методов, направленным на придание растениям новых полезных свойств является генная инженерия. Известно, что повышенный уровень цитокининов в тканях растений повышает устойчивость к стрессовым факторам [1]. Ряд фитопатогенных бактерий синтезируют цитокинины, поэтому могут являться донорами для клонирования генов цитокининового биосинтеза [2].

Цель нашей работы – получить и испытать на устойчивость к ионам меди трансгенные растения табака, экспрессирующие агробактериальный ген изопентинилтрансферазы (*ipt*), ответственный за синтез цитокининов, под сильным конститутивным вирусным промотором 35S CaMV.

Трансгенные растения были получены путем агробактериальной трансформации неповрежденных семян растений табака сорта Petite Havana линии SR1. Агробактериальные штаммы и генетические конструкции любезно предоставлены В. В. Алексеевой и Е. Б. Рукавцовой (УРАН ФИБХ, г. Пущино) [2]. Трансгенная природа канамицин-резистентных линий была доказана методом ПЦР с праймерами к промотору, целевому и селективному гену. Полученные линии были высажены на среду MS с добавлением 100 или 200 мкМ ионов меди. После 4 недель выращивания были оценены параметры роста растений и содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) как маркера стресса. Уровень ПОЛ оценивали спектрофотометрически, по образованию окрашенного продукта с тиобарбитуровой кислотой [3]. Экспрессия целевого гена показана по изменению фенотипа растений [2].

Полученные растения обладали повышенной устойчивости к высоким дозам ионов меди. Мы оценили устойчивость растений в условных баллах, где 3 – это наибольшая устойчивость, растения в стрессовых условиях не отличаются по габитусу от варианта без ионов меди; 2 балла – средняя устойчивость, растения продолжают рост, но при этом значительно отстают в скорости от варианта без стрессора; 1 балл – низкая устойчивость, растения выживают, но практически не растут; 0 – отсутствие устойчивости, растения гибнут на селективной среде. Результаты представлены в табл. 1.

Уже 100 мкМ ионов меди практически полностью ингибировали рост контрольных растений табака, в то время как концентрация в 200 мкМ была летальна. Для половины из полученных трансгенных растений 100 мкМ ионов меди были не токсичны. Доза в 200 мкМ не повлияла на рост одной трансгенной линии, две трансгенных линии выжили на данной концентрации, но не росли, одна линия обладала замедленным ростом. Таким образом, мы убедительно показали, что ген *ipt* и повышенная концентрация цитокининов резко повышает толерантность растений к ионам тяжелых металлов.

Таблица 1

Устойчивость к ионам меди трансгенных и контрольных растений табака

Линия растений	Концентрация ионов меди, мкМ		
	0	100	200
Контроль	3 балла	1 балл	0 баллов
1.1	3 балла	3 балла	2 балла
2.	3 балла	2 балла	1 балл
4.1.	3 балла	2 балла	1 балл
4.2.	3 балла	3 балла	3 балла

Оценка уровня ПОЛ подтвердила результаты визуального обследования растений. Воздействие меди вызвало резкое повышение содержания МДА у контрольных растений. Половина трансгенных растений не показала достоверного возрастания уровня ПОЛ, вторая половина достоверно отличалась от растений без стрессора, но возрастание содержания малонового альдегида было не столь сильным, как у контрольных растений (рис. 1).

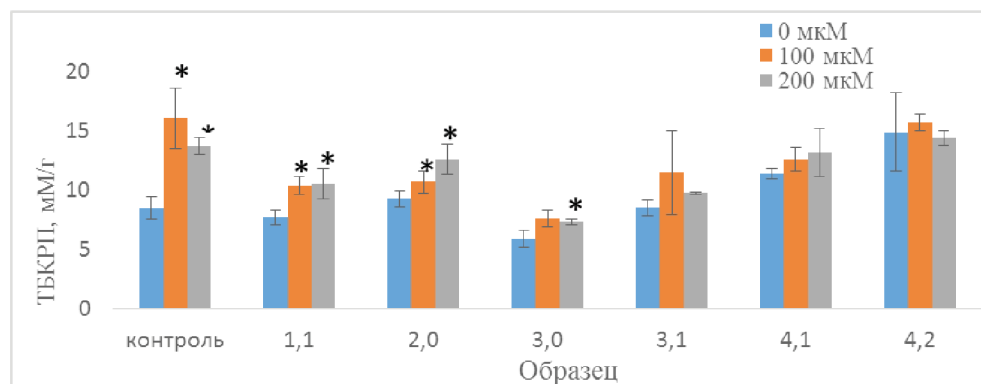


Рис. 1. Содержание продуктов ПОЛ в тканях растений: * – достоверное отличие от варианта на воде (концентрация ионов меди 0 мкМ) при $p < 0,05$

Таким образом, мы получили трансгенные растения табака с повышенным содержанием цитокининов. Показано, что экспрессия агробактериального гена *ipt*, ответственного за синтез цитокининов, защищает трансгенные растения табака от токсичного действия ионов меди. Нами были получены растения, способные выживать на 200 мкМ ионов меди и расти на 100 мкМ, тогда как контрольные растения в таких условиях гибнут. Кроме того, доказана возможность агробактериальной трансформации неповрежденных семян.

Список литературы

1. Романов Г. А. Как цитокинины действуют на клетку // Физиология растений. 2009. Т. 56, № 2. С. 295–319.
2. Физиолого-биохимические особенности растений табака с агробактериальным геном изопентинилтрансферазы / В. В. Алексеева, Е. Б. Рукавцова, Т. В. Шутова и др. // Физиология растений. 2000. Т. 47, № 3. С. 408–415.
3. Некрасова Г. Ф., Малева М. Г. Методы оценки устойчивости растений к стрессовым факторам. Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2007. 28 с.

УДК 578.24

Б. Б. Ильясова, Ж. Б. Тлеукулова,
З. Б. Стамгалиева, А. Б. Ділдабек, Р. Т. Омаров

Евразийский национальный университет им. Л. Н. Гумилева,
Казахстан, г. Астана, ул. Казымукана, 13,
bayansulu.ilyasova@gmail.com

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ВИРУСНОГО СУПРЕССОРА НА АКТИВНОСТЬ МОЛИБДОФЕРМЕНТОВ

Ключевые слова: *Tomato Bushy Stunt Virus* (вирус кустистой карликовости томатов), вирусный супрессор, *Nicotiana benthamiana*, молибдоферменты.

Изучение молекулярных взаимодействий между растениями и патогенами имеет огромное значение в создании методологических подходов для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. В настоящее время известно огромное количество вирусов, поражающих большинство растений.

Tomato bushy stunt virus (TBSV) представитель семейства *Tombusvirus*, род *Tombusviridae*. Геном TBSV включает 4776 нуклеотидов с пятью основными открытыми рамками считывания. Вирус TBSV является эффективной и удобной моделью в работах по изучению молекулярных взаимодействий растений и вирусов [1]. Белок-супрессор P19, кодируемый геном TBSV обеспечивает защиту геномной РНК вируса путем связывания коротких интерферирующих РНК дуплексов, тем самым блокируя РНК-интерференцию на начальном этапе инфекции [2]. Системная инфекция и развитие симптомов неразрывно связана с уровнем накопления P19 в растении [3].

Целью нашего исследования является влияние экспрессии супрессорного белка на активность молибдоферментов. Данные ферменты играют важную функцию в метаболизме растений и вовлечены в механизмы устойчивости к биотическим и абиотическим факторам. К молибденсодержащим ферментам относятся оксидоредуктазы, гидроксилазы, дегидрогеназы [4]. Нитратредуктаза и нитрогеназа участвуют в ассимиляции азота, ксантиндегидрогеназа играет значительную роль в метаболизме N-гетероциклических соединений. Альдегидоксидаза растений является ключевым ферментом в синтезе абсцизовой кислоты [5]. Последние исследования указывают на важную роль данного